

CITATION NO.: 76  
SERIAL NO.: 10737.144  
FILING DATE: 12/15/2003  
IDS FILING DATE: 03/23/2009  
INVENTOR: Yum, et al.  
DOCKET NO.: DURE-050

⑤

Int. Cl. 2:

C 07 C 103/52

⑨

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

C 07 C 102/00

A 61 K 37/02

DEUTSCHES



PATENTAMT

THE BRITISH LIBRARY

13 DEC 1977

SCIENCE REFERENCE LIBRARY

DT 27 20 245 A 1

⑪

# Offenlegungsschrift 27 20 245

⑫

Aktenzeichen:

P 27 20 245.5

⑬

Anmeldetag:

5. 5. 77

⑭

Offenlegungstag:

24. 11. 77

⑳

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

11. 5. 76 Großbritannien 19327-76

⑤④

Bezeichnung:

Polypeptide

⑦①

Anmelder:

Imperial Chemical Industries Ltd., London

⑦④

Vertreter:

Fincke, H., Dr.-Ing.; Bohr, H., Dipl.-Ing.; Staeger, S., Dipl.-Ing.;  
Kneißl, R., Dr.rer.nat.; Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦⑦

Erfinder:

Dutta, Anand Swaroop; Furr, Barrington John Albert;  
Giles, Michael Brian; Macclesfield, Cheshire (Großbritannien)

DT 27 20 245 A 1

PATENTANSPRÜCHE

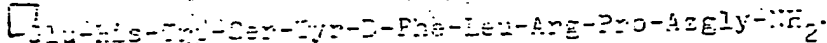
1. Polypeptide der Formel

**AS 05 72 Hingeeempneno**

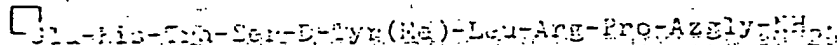
worin A für D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht oder A für Azgly oder Azala steht, B für Leu steht, E für eine direkte Bindung steht und F für ein Äthylaminoradikal steht, sowie die pharmazeutisch und veterinär zulässigen Säureadditionssalze derselben.

2. Polypeptide nach Anspruch 1, worin A für D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.
3. Polypeptide nach Anspruch 1, worin A für Azgly oder Azala steht, B für Leu steht, E für eine direkte Bindung steht und F für ein Äthylaminoradikal steht.
4. Polypeptide nach Anspruch 1, worin A für D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.
5. Polypeptide nach Anspruch 1, worin A für D-Tyr(Me), D-Ser(Bu<sup>t</sup>) oder D-Phe steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.

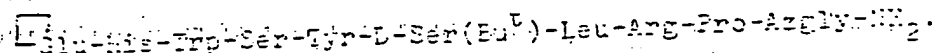
6. Das Polypeptid der Formel



7. Das Polypeptid der Formel



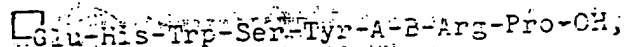
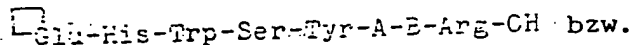
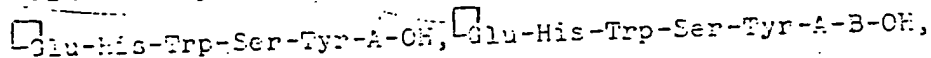
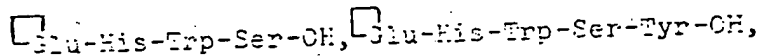
8. Das Polypeptid der Formel



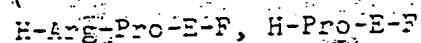
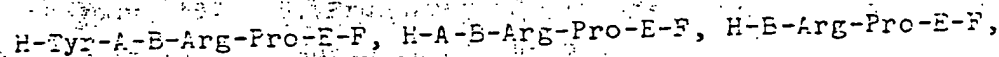
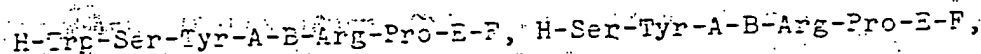
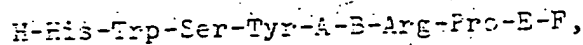
9. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch

(a) Wegnahme ein oder mehrerer üblicher Peptidschutzgruppen von einem geschützten Polypeptid, so daß eine Verbindung der Formel I erhalten wird;

(b) Umsetzung von  $\square$  Glu-OH,  $\square$  Glu-His-OH,  $\square$  Glu-His-Trp-OH,

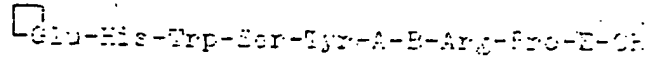


oder eines geeigneten aktivierten Derivats davon mit



bzw. H-Azgly-NH<sub>2</sub> oder einem geeigneten aktivierten Derivat davon in einer Standardpeptidkopplungsreaktion; oder

(c) Umsetzung einer Carbonsäure der Formel



oder eines aktivierten Derivats davon mit Ammoniak oder Äthylamin.

10. Pharmazeutische oder veterinäre Zusammensetzung, welche ein Polypeptid nach Anspruch 1 gemeinsam mit einem nicht-giftigen pharmazeutisch oder veterinär zulässigen Verdünnungsmittel oder Trägermittel enthält.
11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, welche eine für orale Verabreichung geeignete Form aufweist.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 10, welche eine für parenterale Verabreichung geeignete Form aufweist.

PATENTANWÄLTE  
DR.-ING. H. FINCKE, DIPL.-ING. H. BOHR  
DIP.-ING. S. STÄGER, DR. rer. nat. H. KNEISS

709847/0899

RECHNUNGSFÜHRER  
DR.-ING. H. FINCKE  
DIPL.-ING. H. BOHR  
DIPL.-ING. S. STAEGER  
DR. rer. nat. R. KNEISSL

MÜNCHEN 5.  
Müllersstraße 31  
Fernruf: (089) 26 60 60  
Telegraphenamt: Claims München  
Telex: 5239 03 claim d

2720245

Mappe No. 24253 - Dr. K/hö  
Bitte in der Antwort angeben

ICI CASE PH. 28772

Dr. Fincke, Bohr, Staege, Dr. Kneissl - Müllersstr. 31 - 8000 München 5

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LTD.  
London - Großbritannien

"Polypeptide"

---

PRIORITÄT: 11. Mai 1976 - Großbritannien - 19327/76

---

Die Erfindung bezieht sich auf Polypeptide, welche Luliberin-agonisteigenschaften besitzen. Luliberin ist der international übliche Trivialname für LH-RF (luteinising hormone releasing factor) (J. Biol. Chem., 1975, 250, 3215).

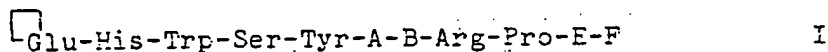
Es ist bekannt (Dutta, Furr, Giles und Morley, Clinical Endocrinology, 1976, 5, Ergänzung, S. 291s-298s), daß der Einbau von  $\alpha$ -Azaamino-säuren an der 6- oder 10-Stellung von

709847/0899

-2-

Luliberin Verbindungen ergibt, die hinsichtlich der Freisetzung von Luteinisierungshormon (LH) aus der Hypophyse weniger kräftig sind als das Ausgangsmolekül. Es wurde nunmehr gefunden, daß der Einbau von Azaglycin an der 10-Stellung in Verbindung mit dem Einbau verschiedener D- $\alpha$ -Aminosäuren an der 6-Stellung in Luliberin oder der Einbau von Azaglycin oder Azalanin an der 6-Stellung in Verbindung mit dem Ersatz des endständigen Glycinamids durch ein Äthylaminoradikal in Luliberin Verbindungen ergibt, die hinsichtlich der Freisetzung von Luteinisierungshormon aktiver sind als Luliberin.

Gemäß der Erfindung werden also Polypeptide der Formel



worin A für D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht, oder A für Azgly oder Azala steht, B für Leu steht, E für eine direkte Bindung steht und F für ein Äthylaminoradikal steht, sowie die pharmazeutisch und veterinär zulässigen Säureadditionssalze davon vorgeschlagen.

In der obigen Formel I und in der gesamten Beschreibung werden die Aminosäurereste durch ihre Standardabkürzungen (Pure and Applied Chemistry, 1974, 40, 317-331) bezeichnet. Ein  $\alpha$ -Aza-aminosäurerest ist ein solcher, in welchem das  $\alpha$ -CH einer Aminosäure durch Stickstoff ersetzt worden ist. Die Abkürzung für eine  $\alpha$ -Aza-aminosäure leitet sich von der entsprechenden Aminosäure durch Hinzufügung der Vorsilbe "Az" ab. Somit steht Azgly für Azaglycin und Azala für Azalanin.

Wenn die Konfiguration der betreffenden Aminosäure nicht angegeben ist, dann besitzt diese Aminosäure (außer der  $\alpha$ -Aza-aminosäuren, die in der Nachbarschaft der Carboxygruppe kein asymmetrisches Zentrum enthalten) die natürliche L-Konfiguration.

Spezielle Gruppen von Verbindungen innerhalb der Erfindung sind die folgenden:

Verbindungen, worin A für D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.

Verbindungen, worin A für Azgly oder Azala steht, B für Leu steht, E für eine direkte Bindung steht und F für ein Äthylaminoradikal steht.

Verbindungen, worin A für D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu<sup>t</sup>), D-Phe, D-Ala oder D-Trp steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.

Eine bevorzugte Gruppe von erfindungsgemäßen Verbindungen wird durch diejenigen gebildet, worin A für D-Tyr(Me), D-Ser(Bu<sup>t</sup>) oder D-Phe steht, B für Leu oder MeLeu steht, E für Azgly steht und F für ein Aminoradikal steht.

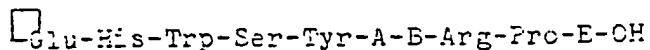
Die drei bevorzugten erfindungsgemäßen Verbindungen besitzen die folgenden Strukturen:

- ☐ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Phe-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub>
- ☐ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Tyr(Me)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub>
- ☐ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub>

Spezielle pharmazeutisch oder veterinär zulässige erfindungsgemäße Säureadditionssalze sind beispielsweise Hydrochloride, Phosphate, Citrate oder Acetate.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können durch an sich bekannte Verfahren für die Herstellung von chemisch analogen Verbindungen erzeugt werden. Deshalb betrifft die Erfindung weiterhin die folgenden Verfahren, wobei A, B E oder F die oben angegebenen Bedeutungen besitzen.

- (a) Ein oder mehrere herkömmliche Peptidschutzgruppen werden von einem geschützten Polypeptid entfernt, so daß die Verbindung der Formel I entsteht;
- (b) Umsetzung von  $\square$ Glu-OH,  $\square$ Glu-His-OH,  $\square$ Glu-His-Trp-OH,  $\square$ Glu-His-Trp-Ser-OH,  $\square$ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH,  $\square$ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-OH,  $\square$ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-OH,  $\square$ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-OH bzw.  $\square$ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-OH, oder eines geeigneten aktivierten Derivats davon mit H-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-A-B-Arg-Pro-E-F, H-B-Arg-Pro-E-F, H-Arg-Pro-E-F, H-Pro-E-F bzw. H-Azgly-NH<sub>2</sub> oder einem geeigneten Derivat davon, in einer Standardpeptidkupplungsreaktion; oder
- (c) eine Carbonsäure der Formel



II



oder ein aktiviertes Derivat davon wird mit Ammoniak oder Äthylamin umgesetzt.

Beim Verfahren (a) können sovieler Schutzgruppen im Ausgangsmaterial vorliegen, als Radikale vorhanden sind, die geschützt werden müssen, beispielsweise einige oder alle Radikale, die im Produkt als freie Radikale der Formel OH oder als basische Radikale der Formel NH vorliegen.

Beim Verfahren (a) kann die Schutzgruppe oder können die Schutzgruppen solche sein, die in einem Standardhandbuch über Peptidchemie zu finden sind, wie z.B. M. Bodansky und M.A. Ondetti, "Peptide Synthesis", Interscience, New York, 1966, Kapitel IV; F.M. Finn und K. Hofmann, "The Proteins", Band II, herausgegeben von E. Neurath und R.L. Hill, Academic Press Inc., New York, 1976, Seite 106; "Amino-acids, Peptides and Proteins" (periodische Spezialistenberichte), The Chemical Society, London, Bände 1 bis 8. Verschiedene Verfahren zur Entfernung der Schutzgruppen sind in diesen Büchern ebenfalls beschrieben.

Beim Verfahren (a) ist eine besonders brauchbare Schutzgruppe für NH das Benzyloxycarbonylradikal und eine besonders brauchbare Schutzgruppe für OH das Benzylradikal. Beide diese Gruppen können leicht durch Hydrogenolyse entfernt werden, beispielsweise in Gegenwart eines Palladium-auf-Holzkohle-Katalysators.

Beim Verfahren (a) ist eine weitere besonders geeignete Schutzgruppe für NH das t-Butoxycarbonylradikal und eine weitere besonders geeignete Schutzgruppe für OH das t-Butylradikal. Beide diese Gruppen können leicht durch Behandlung mit einer Säure, wie z.B. Salzsäure oder Trifluoroessigsäure, entfernt werden.

Beim Verfahren (a) ist eine weitere besonders geeignete Schutzgruppe für NH das Benzyloxycarbonyl- oder t-Butoxycarbonylradikal und ist eine weitere besonders günstige Schutzgruppe für OH das t-Butylradikal. Diese Schutzgruppen können leicht durch Behandlung mit HBr in Essigsäure entfernt werden.

Beim Verfahren (b) kann irgendeine der Standardpeptidkupplungsreaktionen verwendet werden, wie sie beispielsweise in einem Standardhandbuch der Peptidchemie beschrieben sind, wie z.B. in dem obengenannten Handbuch von Bodansky und Ondetti, Kapitel V, und in den Bänden 1 bis 8 der periodischen Spezialistenberichte der Chemical Society.

Beim Verfahren (b) ist eine spezielle Kupplungsreaktion eine Azidkupplung, eine Aktivesterkupplung oder eine Kupplung, bei der ein N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und 1-Hydroxybenztriazol eine Rolle spielen. Eine bevorzugte Kupplungsreaktion ist eine Azidkupplung, und zwar insbesondere eine derartige Kupplung, bei der sich die His-Trp- oder Ser-Tyr-Peptidbindung bildet.

Beim Verfahren (c) ist ein geeignetes aktiviertes Derivat des Ausgangsmaterials beispielsweise ein Ester oder Anhydrid. Im Falle eines aktivierten Derivats kann die Reaktion dadurch ausgeführt werden, daß man das aktivierte Derivat mit Ammoniak oder Äthylamin in Gegenwart eines Verdünnungsmittels oder Lösungsmittels zusammenbringt. In den Fällen, in denen das Ausgangsmaterial die freie Säure der Formel II ist, wird die Reaktion mit Ammoniak oder Äthylamin zweckmäßig durch ein Standardpeptidkupplungsreagens, wie z.B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, zustande gebracht.

Die Ausgangsmaterialien für die Verwendung beim erfindungsgemäßen Verfahren können aus bekannten Verbindungen durch Standardpeptidkupplungsreaktionen, Standardpeptidschutzreaktionen und Standardpeptidschutzgruppenabspaltungsreaktionen hergestellt

709847/0899

werden, wie sie Fachleuten auf diesem Gebiet allgemein bekannt sind und wie sie in den Beispielen 1 bis 10 angegeben sind.

Wie bereits oben festgestellt, besitzen die erfindungsgemäßen Verbindungen Luliberinagonisteigenschaften, d.h., daß sie ähnliche Wirkungen wie Luliberin aufweisen, ein vom Hypothalamus sekretiertes natürliches Hormon, das auf die Hypophyse wirkt und diese zur Freisetzung von Luteinisierungshormon (LH) und Follikelstimulierungshormon (FSH) veranlaßt. Diese beiden Hypophysenhormone spielen bei reproduktiven Prozessen eine Rolle, wobei letzteres, nämlich FSH, in den Ovarien eine Förderung der Reifung der Follikeln bewirkt und ersteres, nämlich LH, die Ovulation induziert. Die Verbindungen der Formel I sind in unerwarteter Weise hinsichtlich des Vermögens der Freisetzung von LH wesentlich kräftiger als Luliberin und eignen sich deshalb für die Beeinflussung und/oder Verbesserung der Vermehrung bei Tieren. Es eignet sich insbesondere für die Züchtung von großen Haustieren während eines Anöstrusses und bei jeder künstlich beeinflussten Züchtung zur genauen Bestimmung der Ovulation. Es eignet sich auch für die Heilung von Unfruchtbarkeitszuständen bei Mann und Frau.

Der Luliberinagonisteffekt der erfindungsgemäßen Verbindungen kann beispielsweise durch das Vermögen demonstriert werden, eine Ovulation bei mit Androgen sterilisierten Ratten mit konstantem Östrus zu induzieren oder LH und FSH (gemessen durch doppelte Antikörperradioimmunoassay) in das Blutplasma von unreifen männlichen Ratten oder in das Blutplasma von anöstrischen oder diöstrischen Mutterschafen abzugeben.

Der obige Test an mit Androgen sterilisierten Ratten wird wie folgt ausgeführt:

709847/0899

Mit Androgen sterilisierte weibliche Ratten, die durch Behandlung am 3., 4. und 5. Tag ihres Alters mit 100 µg Testosteronpropionat präpariert worden sind, zeigen einen beständigen östrischen Vaginalschleim und zahlreiche präovulatorische Follikeln in den Ovarien. Die Verabreichung von Luliberin und aktiven Analogen verursacht die Abgabe eines ovulierenden Anstiegs an LH und FSH, der durch die Anwesenheit von Eiern in den Fallopischen Tuben und frischen Corpora lutea in den Ovarien bestimmt werden kann.

Alle in dieser Beschreibung genannten beispielhaften Verbindungen sind hinsichtlich ihres Vermögens, eine Ovulation bei Ratten mit konstantem Östrus zu induzieren, aktiver als Luliberin und zeigen außerdem keine giftigen Wirkungen, wenn sie in mindestens der 4fachen Dosis ihrer minimal aktiven Dosis verabreicht werden. Insbesondere sind die erfindungsgemäßen bevorzugten Verbindungen, die in den Beispielen 4, 6 und 7 beschrieben sind, annähernd 100mal so aktiv als Luliberin. Sie zeigen außerdem keinerlei toxische Effekte, wenn sie in der 100fachen Menge ihrer minimalen effektiven Dosis verabreicht werden.

Gemäß der Erfindung werden weiterhin pharmazeutische oder veterinäre Zusammensetzungen vorgeschlagen, die als aktiven Bestandteil eine erfindungsgemäße Verbindung gemeinsam mit einem pharmazeutisch oder veterinär zulässigen Verdünnungsmittel oder Trägermittel enthalten.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können die verschiedensten Formen aufweisen, beispielsweise eine für orale oder buccale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. Tabletten, Kapseln, Lösungen oder Suspensionen; eine für nasale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. Schnupfmittel, Nasenspray oder Nasentropfen; eine für vaginale oder rektale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. Suppositorien; oder für eine paren-

709847/0899

terale Verabreichung geeignete Form, wie z.B. sterile injizierbare Lösungen oder Suspensionen.

Im allgemeinen werden die obigen Zusammensetzungen in üblicher Weise unter Verwendung herkömmlicher Exzipienzien hergestellt. Zusammensetzungen für orale Verabreichung können jedoch eine Beschichtung aufweisen, um den aktiven Polypeptidbestandteil von den Wirkungen von Enzymen im Magen zu schützen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können außerdem zusätzlich zu einem erfindungsgemäßen Polypeptid ein oder mehrere bekannte Wirkstoffe enthalten, die aus Prostaglandinderivaten ausgewählt sind, wie z.B. Prostaglandin- $F_{2\alpha}$ , Cloprostinol oder Fluprostinol, oder einen anderen Wirkstoff, wie z.B. Clomiphen oder Tamoxifen.

Bevorzugte erfindungsgemäße Zusammensetzungen sind solche, die sich für orale Verabreichung in Einheitsdosierungsform eignen, wie z.B. eine Tablette, eine Kapsel, ein Trank oder ein Bolus, wobei dieselben 2,5 bis 500 mg und vorzugsweise 10 bis 100 mg eines Polypeptids in jeder Einheitsdosierungsform aufweisen, oder solche, die sich für parenterale Verabreichung eignen, welche 5  $\mu$ g bis 1 mg eines Polypeptids je ml und vorzugsweise 10  $\mu$ g bis 100  $\mu$ g eines Polypeptids je ml Lösung enthalten.

Eine parenterale Zusammensetzung ist vorzugsweise eine Lösung in isotonischer Kochsalzlösung oder isotonischer Dextrose, nötigenfalls auf einen pH von 5 bis 9 gepuffert. Alternativ kann die parenterale Zusammensetzung so aufgebaut sein, daß sie den Wirkstoff langsam abgibt, in welchem Falle die Menge des Polypeptids je Einheitsdosierungsform im allgemeinen größer ist, als sie erforderlich ist, wenn eine herkömmliche injizier-

bare Form verwendet wird. Eine bevorzugte parenterale Formulierung mit langsamer Wirkstoffabgabe enthält 100 µg bis 1 mg Polypeptid je Einheitsdosierung.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen werden im allgemeinen so verabreicht, daß die tägliche Dosis 50 µg bis 20 mg/kg beträgt. Eine tägliche parenterale Dosis, beispielsweise durch intravenöse, subkutane oder intramuskuläre Injektion oder Infusion beträgt 0,2 µg/kg bis 100 µg/kg. Bei Menschen entsprechen diese Dosen einer gesamten täglichen Dosis von 3,5 mg bis 1,4 g bei oraler Verabreichung und einer gesamten täglichen Dosis von 14 µg bis 7 mg bei parenteraler Verabreichung. Wenn die Verabreichung über die Schleimmembranen erfolgt, dann liegt die Dosis zwischen den oben angegebenen Bereichen für orale und parenterale Verabfolgung.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

In den Beispielen bezieht sich  $R_f$  auf die aufsteigende Dünnschichtchromatografie (t.l.c.) auf Silicagelplatten (Kieselgel G). Die in dieser Chromatografie verwendeten Lösungsmittelsysteme waren Butan-1-ol/Essigsäure/Wasser (4:1:5 V/V) ( $R_fA$ ), Butan-1-ol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (15:3:12:10 V/V) ( $R_fB$ ), Butan-2-ol/3% G/V wäBriges Ammoniumhydroxyd (3:1 V/V) ( $R_fC$ ), Acetonitril/Wasser (3:1 V/V) ( $R_fD$ ), Aceton/Chloroform (1:1 V/V) ( $R_fE$ ), Chloroform/Äthanol (1:4 V/V) ( $R_fF$ ), Cyclohexan/Äthylacetat (1:1 V/V) ( $R_fG$ ), Cyclohexan/Äthylacetat/Methanol (1:1:1 V/V) ( $R_fH$ ), Chloroform/Methanol/Wasser (11:8:2 V/V) ( $R_fK$ ), Chloroform/Methanol (19:1 V/V) ( $R_fP$ ) und Chloroform/Methanol (9:1 V/V) ( $R_fQ$ ). In allen diesen Fällen wurden die Platten unter UV-Licht geprüft und mit Fluorescamin, Ninhydrin und Chlor-Stärke-Jodid-Reagentien behandelt. Wenn nichts anderes angegeben ist, dann bedeuten die angegebenen  $R_f$ -Werte, daß

709847/0899

ein einziger Fleck durch diese Verfahren bestimmt wurde.

Säurehydrolysate aller in dieser Beschreibung beschriebenen Produkte wurden dadurch hergestellt, daß das Peptid oder geschützte Peptid mit 6 n Salzsäure, die 1% (G/V) Phenol enthielt in einem verschlossenen evakuierten Rohr 16 st auf 100°C erhitzt wurde. Die Aminosäurezusammensetzung eines jeden Hydrolysats wurde mit einem LoCarte-Aminosäure-Analysator bestimmt. Die Zusammensetzung entsprach in jedem Fall der Erwartung. Der Ausdruck "in üblicher Weise aufgearbeitet", der in den Beispielen verwendet wird, besagt, daß nach der Umsetzung jeder feste Rückstand durch Filtration entfernt wurde, das Filtrat unter 40°C zur Trockne eingedampft wurde, der Rückstand in Äthylacetat mit einer 20%igen Zitronensäurelösung, Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet wurde und das Äthylacetat im Vakuum eingedampft wurde, wobei die Verbindung zurückblieb.

#### Beispiele 1 bis 10

#### Synthese von L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-A-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-E-F. Allgemeines Verfahren (m). (Schemata 1 und 2)

Zu einer auf 0°C gekühlten und gerührten Suspension von 0,2 mMol L-Pyroglutamyl-L-histidinhydrazid in 0,9 ml Dimethylformamid und 0,7 ml Dimethylsulfoxyd wurden 0,8 mMol 5,7n Chlorwasserstoff in Dioxan zugegeben. Nach einem 5 min dauernden heftigen Rühren wurde eine klare Lösung erhalten. Die Lösung wurde auf -20°C abgekühlt, 0,22 mMol t-Butylnitrit wurden zugegeben, und das Rühren wurde 25 min fortgesetzt. Die Temperatur wurde dann auf -30°C abgesenkt und die Lösung wurde durch Zusatz

709847/0899

von 0,8 mMol Triäthylamin neutralisiert. Ein auf  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühltes Gemisch von 0,1 mMol L-Tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-A-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-E-F-dihydrochlorid (erhalten durch Hydrogenolyse des N-Benzylloxycarbonylderivats in 80%igem (V/V) wäbrigem Methanol mit einem Gehalt an zwei Äquivalenten Chlorwasserstoff über einem 5%igen (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator während 16 st) und aus 0,1 mMol Triäthylamin in 1 ml Dimethylformamid wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 24 st bei  $4^{\circ}\text{C}$  gerührt. Dimethylformamid wurde im Vakuum abgedampft, und der Rückstand wurde auf Sephadex LH-20 chromatografiert, wobei Dimethylformamid als Eluiermittel verwendet wurde. Das Peptid-hydrochlorid wurde weiter durch Verteilungschromatografie auf Sephatex G-25 gereinigt, wobei das Lösungsmittelsystem n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Pyridin (5:1:5:1 V/V) verwendet wurde.

Synthese von L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-A-B-L-arginyl-L-prolyl-azaglycinamid. Allgemeines Verfahren (n) (Schemata 3, 4 und 5).

0,2 mMol L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-serin-hydrazid wurden in 4 ml Dimethylformamid aufgelöst und so in das Azid überführt, wie es beim Verfahren (m) beschrieben ist. Dieses wurde, wie es beim Verfahren (m) beschrieben ist, mit 0,15 mMol L-Tyrosyl-A-B-L-arginyl-L-prolyl-azaglycinamid-hydrochlorid (hergestellt durch katalytische Reduktion von N-Benzylloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-A-L-leucyl-(N<sup>6</sup>-nitro)-L-arginyl-L-prolyl-azaglycinamid in 80%igem (V/V) wäbrigem Methanol während 20 st über einem 5%igen (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator) gekuppelt und das fertige Produkt wurde wie oben beschrieben als Hydrochlorid gereinigt.

709847/0899



Synthese von L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-A-B-L-arginyl-L-prolyl-azaglycin-amid. Allgemeines Verfahren (o) (Schemata 4 und 6).

Eine Lösung von 50 mg des geschützten Decapeptidderivats, das Ser(Bu<sup>t</sup>) in der 6-Stellung oder Tyr(Bu<sup>t</sup>) in der 5-Stellung aufwies, in 5 ml 90%iger (V/V) wässriger Trifluoroessigsäure wurde hergestellt. Drei Tropfen  $\beta$ -Mercaptoäthanol wurden zugegeben und die Lösung wurde 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde einmal aus Wasser und zweimal aus t-Butanol gefriergetrocknet. Die Ausbeute war 90 bis 100%.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen, die durch eines dieser drei allgemeinen Verfahren hergestellt wurden, sind als Beispiele 1 bis 10 in der folgenden Tabelle aufgeführt.

2720245

□ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F

Beispiel No.	A	B	E	F	Verfahren	Ausbeute %	Papierelektrophorese $R_F$ (relativ zu Inuliberin)		$R_F^A$
							pH 2.1	pH 6.5	
1	Azgly	Leu	-	$-NH_2^+H_5$	m	25	0.98	1.03	0.28
2	Azala	Leu	-	$-NH_2^+H_5$	m	42	0.97	1.0	0.30
3	D-Ala	Leu	Azgly	$NH_2$	m	32	0.97	1.0	0.30
4	D-Phe	Leu	Azgly	$NH_2$	n	40	1.0	0.71	0.27
5	D-Trp	Leu	Azgly	$NH_2$	n	15	0.53	0.37	0.37
6	D-Tyr(Me)	Leu	Azgly	$NH_2$	n	15	0.92	0.87	0.25
7	D-Ser( $Bu^t$ )	Leu	Azgly	$NH_2$	n	31	0.94	0.96	0.25
8	D-Ser	Leu	Azgly	$NH_2$	o	95	0.94	0.96	0.25
9	D-Phe	MeLeu	Azgly	$NH_2$	o	46	0.84	0.87	0.35
10	D-Tyr(Me)	MeLeu	Azgly	$NH_2$	n	26	0.87	0.90	0.34

Die Ausgangsmaterialien für die Verwendung in den obigen Verfahren können so erhalten werden, wie es in den folgenden Schemata 1 und 2 (Verfahren (m)), in den Schemata 3, 4 und 5 (Verfahren (n)) und in den Schemata 4 und 6 (Verfahren (o)) beschrieben ist.

Bei diesen Schemata wurden die folgenden Konzentrationen verwendet:

OCp = 2,4,5-Trichlorphenylester  
Bzl = Benzyl  
Z = Benzyloxycarbonyl  
Boc = t-Butoxycarbonyl  
DMF = Dimethylformamid

Die eingekreisten Zahlen beziehen sich auf die betreffende Stufe.

Glu	His	Tyr	Ser	Leu	Arg	Phe
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				Z-CH <sub>2</sub>
		(5) (6)				(1)
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				Z-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(7) (8)				(2)
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				H-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(9) (10)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(11) (12)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(13) (14)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(15) (16)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(17) (18)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(19) (20)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(21) (22)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(23) (24)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(25) (26)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(27) (28)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(29) (30)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(31) (32)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(33) (34)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(35) (36)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(37) (38)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(39) (40)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(41) (42)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(43) (44)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(45) (46)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(47) (48)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(49) (50)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(51) (52)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(53) (54)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(55) (56)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(57) (58)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(59) (60)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(61) (62)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(63) (64)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(65) (66)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(67) (68)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(69) (70)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(71) (72)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(73) (74)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(75) (76)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(77) (78)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(79) (80)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(81) (82)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(83) (84)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(85) (86)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(87) (88)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(89) (90)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(91) (92)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(93) (94)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(95) (96)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(97) (98)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		(99) (100)				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>
		Z-OCp H <sub>2</sub> -N-Boc				CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>

A = Azoglycin (R=H), Azoglycin (R=CH<sub>3</sub>)

Schedule 1

[illegible]

Glu	His	Tyr	Ser	Trp	Leu	Arg	Pro	Asp
-Ocp	H-O <sub>2</sub>	Z-O <sub>2</sub>	H-O <sub>2</sub>	Z-O <sub>2</sub>	H-O <sub>2</sub>	H-O <sub>2</sub>	Z-O <sub>2</sub>	H-O <sub>2</sub>
(16)	(16)	Bzl	H-O <sub>2</sub>	(12)	(51)	H-O <sub>2</sub>	(25)	(25)
(17)	(17)	Bzl	H-O <sub>2</sub>	(47)	(52)	H-O <sub>2</sub>	(26)	(26)
(46)	(46)	Bzl	H-O <sub>2</sub>	(47)	(53)	H-O <sub>2</sub>	(38)	(38)
(48)	(48)	Bzl	H-O <sub>2</sub>	(47)	(54)	H-O <sub>2</sub>	(39)	(39)
(49)	(49)	Bzl	H-O <sub>2</sub>	(47)	(55)	H-O <sub>2</sub>	(40)	(40)
		H	H <sub>3</sub>			H <sup>+</sup>		
						H <sup>+</sup>		

A = D-Pro, D-Trp,

Revised

2720245

709847/0899



[illegible]Conclusions

709847/0899



[illegible]

9 a.m. 6

Stufe ①.

19,94 g (80 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-prolin und 8,8 ml (80 mMol) N-Methylmorpholin wurden in 200 ml trockenem Tetrahydrofuran aufgelöst und die Lösung wurde auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. 7,15 ml (76 mMol) Äthylchloroformiat wurden tropfenweise zugegeben, und nach einem 2 Minuten dauernden Rühren wurden 20 ml (300 mMol) einer auf  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten 70%igen wässrigen Lösung von Äthylamin zugegeben, worauf das Rühren 18 st bei  $4^{\circ}\text{C}$  fortgesetzt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet und der Rückstand wurde aus Äthylacetat / Petroläther (Kp  $60-80^{\circ}\text{C}$ ) kristallisiert. Ausbeute 12,97 g (58,7%), Fp  $107-108^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25,5} -43,88^{\circ}$  (c, 1 in Methanol),  $R_{\text{fD}}$  0,69,  $R_{\text{fE}}$  0,53,  $R_{\text{fF}}$  0,67,  $R_{\text{fH}}$  0,62,  $R_{\text{fP}}$  0,57,  $R_{\text{fQ}}$  0,66.

Stufe ②.

Katalytische Reduktion über 5% Pd/C in wässrigem Äthanol mit einem Gehalt an 1 Äquivalent Chlorwasserstoff während 5 st bei Raumtemperatur.

Stufe ③.

Eine Lösung von 13,5 g (42,3 mMol)  $\text{N}^{\alpha}$ -t-Butoxycarbonyl-N $^{\omega}$ -nitro-L-arginin, 7,15 g (47 mMol) L-Prolin-äthylamid-hydrochlorid, 11,5 g (85 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 6,58 ml (47 mMol) Triäthylamin in DMF wurde auf  $0^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, und 9,13 g (44,4 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gerührt und zur Entfernung von festem Material filtriert, worauf das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingedampft wurde. Der Rückstand wurde zwischen Äthylacetat und Wasser durch eine Gegenstromverteilung (4 Übergänge) verteilt. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene eingedampft und der Rück-

stand wurde zwischen N-Butanol und 5%iger (V/V) wäßriger Essigsäure durch Gegenstromverteilung (12 Übergänge) verteilt. Das durch Eindampfen der vereinigten N-Butanolphasen erhaltene rohe Peptid wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform und 10%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Eluierlösungsmittel gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockene eingedampft, und eine wäßrige Lösung des Rückstands wurde durch eine Anionenaustauschharzkolonne (AG 1-X2) hindurchgeführt, um dieses  $N^{\alpha}$ -t-Butoxycarbonyl- $N^{\omega}$ -nitro-arginin zu entfernen. Die Kolonne wurde dann mit Wasser gewaschen und die vereinigten wäßrigen Phasen und Waschflüssigkeiten wurden gefriergetrocknet, wobei das Azapeptidderivat erhalten wurde. Ausbeute 16,67 g. (89%), Fp 109-111°C (Zersetzung),  $[\alpha]_D^{25}$  -39,0° (c, 1 in Methanol),  $R_fA$  0,62,  $R_fB$  0,74,  $R_fC$  0,59,  $R_fD$  0,70,  $R_fE$  0,20,  $R_fF$  0,60,  $R_fH$  0,61,  $R_fK$  0,85,  $R_fQ$  0,13.

#### Stufe 4.

Das N-t-Butoxycarbonylderivat wurde in Äthylacetat aufgelöst und mit 3n HCl in Äthylacetatlösung (4 Äquivalente) während 1 st bei Raumtemperatur behandelt.

#### Stufe 5). (R=H)

Eine Lösung von 2,90 g (22 mMol) t-Butoxycarbonylhydrazid und 11,71 g (20 mMol) des 2,4,5-Trichlorophenylesters von N-Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin in 40 ml Dimethylformamid wurde über Nacht bei Raumtemperatur gehalten. Aufarbeitung in der üblichen Weise und anschließende Umkristallisation des Rückstands aus Äther/Petroläther (Kp 60 bis 80°C) ergab das geschützte Hydrazid als weißes Pulver, 3,46 g, (67%), Fp 126 bis 127°C,  $[\alpha]_D^{25}$  -13,2° (c, 1 in Methanol),  $R_fD$  0,82,  $R_fE$  0,65,

$R_f F$  0,63,  $R_f H$  0,70.

Stufe ⑥. (R=H).

5,19 g (10 mmol) 1-(N-Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl)-2-t-butoxycarbonyl-hydrazid wurden in 50 ml Äthylacetat aufgelöst und mit 8 ml (40 mmol) 5n Salzsäure in Äthylacetat 1 st bei Raumtemperatur behandelt. Das Äthylacetat wurde im Vakuum entfernt, und das Hydrochlorid wurde mit Äther filtriert und getrocknet.

Stufe ⑦. (R=H)

Das obige Hydrochlorid wurde in 75 ml Tetrahydrofuran aufgenommen, und 1,15 g (8 mmol) Triäthylamin wurden zugegeben, worauf sich der Zusatz von 1,36 g (8 mmol) n-Carbonyl-L-leucin-methylester anschloß. Nach 16 st bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in der üblichen Weise aufgearbeitet, worauf der Rückstand aus Äthylacetat/Petroläther ( $K_p$  60-80°C) umkristallisiert wurde. Dabei wurde das Azatripeptidderivat erhalten, 4,57 g. (77,7%),  $F_p$  156-157°C,  $[\alpha]_D^{24}$  -10,3° (c, 1 in Methanol),  $R_f D$  0,81,  $R_f E$  0,45,  $R_f P$  0,26,  $R_f Q$  0,47.

Stufe ⑧.

5 ml (100 mmol) Hydrazinhydrat wurden zu einer Lösung von 2,95 g (5 mmol) N-Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosylazaglycyl-L-leucin-methylester in 50 ml Methanol zugegeben. Nach 2 st bei Raumtemperatur wurde das Hydrazid mit Wasser ausgefällt und aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 2,74 g (92,8%),  $F_p$  169-170°C,  $[\alpha]_D^{24}$  -9,05° (c, 1 in Dimethylformamid)  $R_f A$  0,76,  $R_f B$  0,75,  $R_f C$  0,73,  $R_f D$  0,63,  $R_f F$  0,60,  $R_f H$  0,55.

709847/0899

Stufen 9 und 10 (R=H)

1,18 g (2,0 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-azaglycyl-L-leucin-hydrazid wurden in 10 ml Dimethylformamid aufgelöst und nach Abkühlen der Lösung auf  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden 1,46 ml (8 mMol) einer 5,49m Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan und schließlich 0,25 ml (2,2 mMol) t-Butylnitrit zugegeben. Nach 5 min wurde die Lösung auf  $-30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, worauf ein vorgekühltes Gemisch von 0,836 g (2,2 mMol)  $\text{N}^{\omega}$ -Nitro-L-arginyl-L-prolin-äthylamid-hydrochlorid und 1,43 ml (10,2 mMol) Tri-äthylamin in 10 ml Dimethylformamid zugegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde 1 st bei  $-10^{\circ}\text{C}$  und dann 48 st bei  $4^{\circ}\text{C}$  gerührt. Es wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet. Das Pentapeptidderivat wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform und 3%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Eluierlösungsmittel gereinigt, Ausbeute 0,695 g. (38,5%),  $R_fA$  0,71,  $R_fB$  0,72,  $R_fC$  0,84.

Stufe 11 . (R=H)

Katalytische Reduktion mit 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in 80%iger (V/V) wässriger Essigsäure mit einem Gehalt an 2 Äquivalenten Chlorwasserstoff.

Stufe 12 .

Zu einer heftig gerührten und auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlten Lösung von 33,84 g (100 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-L-tryptophan und 11,0 ml (100 mMol) N-Methylmorpholin in 200 ml Tetrahydrofuran wurden 9,0 ml (95 mMol) Äthylchloroformiat zugegeben. Nach 2 min wurde eine auf  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte Lösung von 17,10 g (11 mMol) L-Serinmethylester-hydrochlorid und 12,1 ml (110 mMol) N-Methylmorpholin in 150 ml Dimethylformamid zugegeben und das Rühren wurde 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und 3 st bei Raumtemperatur fortgesetzt.

2720245

Die übliche Aufarbeitung ergab ein Öl. Zwei Kristallisationen aus Äthylacetat/Petroläther, Kp 60-80°C, gaben das Dipeptid-derivat, Ausbeute 30,53 g (69,5%), Fp 140,5-141°C,

$[\alpha]_D^{24} -22,13^\circ$  (c, 1,4 in Dimethylformamid).

### Stufe 13

30,53 g (69,5 mMol) des vorstehenden Esters wurden in 1 l Methanol aufgelöst und 15 ml einer 62%igen (G/V) Lösung von Hydrazinhydrat wurden zugesetzt. Nach 16 st wurde das Hydrazid gesammelt, mit Methanol und Äther gewaschen und aus heißem Äthanol kristallisiert, Ausbeute 23,18 g (75,8%), Fp 178-179°C,  $[\alpha]_D^{24} -25,27^\circ$  (c, 1 in Dimethylformamid)  $R_fD$  0,65,  $R_fE$  0,20,  $R_fF$  0,43,  $R_fH$  0,50.

### Stufen 14 und 15

0,77 ml (4,64 mMol) 6,02n Chlorwasserstoff in Dioxan wurden zu einer auf -20°C abgekühlten und gerührten Lösung von 0,502 g (1,16 mMol) N-Benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-serinhydrazid in 5 ml Dimethylformamid zugegeben, worauf sich der Zusatz von 0,14 ml (1,22 mMol) t-Butylnitrit anschloß. Nach 30 min wurde die Lösung auf -30°C abgekühlt und durch Zusatz von 0,65 ml (4,65 mMol) Triäthylamin neutralisiert. Ein auf -20°C vorgekühltes Gemisch von 0,547 g (0,77 mMol) L-Tyrosylazaglycyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolin-äthylamid-dihydrochlorid und 0,108 ml (0,77 mMol) Triäthylamin in 5 ml Dimethylformamid wurde zugegeben und das Rühren wurde 1 st bei -20°C und 48 st bei 0°C fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und das Filtrat wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft. Das rohe Peptid wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform, 10%igem (V/V) Methanol in Chloroform und einem Gemisch von Chloroform/Methanol/Wasser (11:8:2 V/V) als Eluierlösungsmittel gereinigt, Ausbeute 0,424 g (52,9%),

709847/0899

2720245

$[\alpha]_D^{25} -16,84^\circ$  (c, 1,5 in Methanol),  $R_fA$  0,61,  $R_fC$  0,36,  
 $R_fD$  0,67,  $R_fK$  0,90.

Stufe 18 (R=Me)

Wie Stufe 5), Ausbeute 66%, Fp  $102-104^\circ C$ ,  $[\alpha]_D^{24} -15,5^\circ$   
(c, 1 in Methanol),  $R_fD$  0,76,  $R_fE$  0,68,  $R_fF$  0,76,  $R_fH$  0,74.

Stufe 19 (R=Me)

Wie Stufe 6).

Stufe 20 (R=Me)

Wie Stufe 7), Ausbeute 93%, Fp  $145-146^\circ C$ ,  $[\alpha]_D^{25} +8,7^\circ$  (c,  
1,2 in Methanol),  $R_fA$  0,88,  $R_fB$  0,88,  $R_fC$  0,83,  $R_fD$  0,80,  
 $R_fE$  0,59,  $R_fF$  0,78,  $R_fH$  0,73.

Stufe 21

12 ml (12 mMol) 1n Natriumhydroxyd wurden zu einer gerührten Lösung von 2,41 g (4 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-azalanyl-L-leucin-methylester in 36 ml Methanol bei Raumtemperatur zugegeben, und das Rühren wurde 3 st fortgesetzt. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt und 40 ml einer wäßrigen Lösung, die unter Verwendung des Rückstands hergestellt worden war, wurde mit Zitronensäure auf pH 3 angesäuert und mit Äthylacetat extrahiert. Nach dem Waschen des Äthylacetatextrakts mit Wasser und Trocknen ( $Na_2SO_4$ ) wurde das Lösungsmittel eingedampft, worauf der Rückstand in 200 ml eines Gemischs aus Dimethylformamid und Wasser (3:2 V/V) auf 100 ml einer Kolonne eines AG 1 x-2-Harzes aufgegeben wurde. Die Kolonne wurde mit 50 ml des obigen Lösungsmittels gewaschen und das Tripeptid wurde mit 0,2m Essigsäure in Dimethylformamid/Wasser (3:2 V/V) eluiert. Die Tripeptid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft und der Rückstand

709847/0899

2720245

wurde mit Äther trituriert und gesammelt, Ausbeute 1,22 g (51,7%), Fp 195°C (Zersetzung),  $[\alpha]_D^{24} -25,4^\circ$  (c, 1 in Dimethylformamid).

Stufe (22) (R=Me)

Wie Stufe (28), Ausbeute 43%,  $[\alpha]_D^{25} -25,9^\circ$  (c, 1 in Methanol),  $R_fA$  0,72,  $R_fB$  0,76,  $R_fC$  0,85.

Stufe (23) (R=Me)

Wie Stufe (11).

Stufe 24) (R=Me)

Wie Stufe 15, außer daß das Endprodukt auch durch Gelfiltration auf Sephadex LH-20 in Dimethylformamid nach Silicagelkolonnenchromatografie gereinigt wurde, Ausbeute 63%,  $[\alpha]_D^{25} -24,76^\circ$  (c, 0,8 in Methanol),  $R_fA$  0,58,  $R_fC$  0,42,  $R_fD$  0,65,  $R_fK$  0,95.

Stufe 25

Zu 24,9 g (100 mMol) einer gerührten und auf 0°C abgekühlten Suspension von N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin, 11,2 g (100 mMol) Semicarbazidhydrochlorid und 14,5 ml (100 mMol) Triäthylamin in 200 ml Dimethylformamid wurden 20,6 g (100 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben und das Rühren wurde 16 st bei 4°C fortgesetzt. Dicyclohexylharnstoff wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingedampft. 200 ml Wasser wurden zugegeben und die Lösung wurde mit 3mal 50 ml Äthylacetat extrahiert. Das Produkt fiel aus der wäßrigen Lösung in ungefähr 1 st aus. Umkristallisation aus wäßrigem Methanol ergab das Dipeptidamid, Ausbeute 16,5 g (53,9%), Fp 189-190°C,  $[\alpha]_D^{24} -43,6^\circ$  (c, 1,4 in Dimethylformamid),  $R_fD$  0,54,  $R_fF$  0,52,  $R_fH$  0,38,  $R_fK$  0,78.

709847/0899



Stufe 26)

Katalytische Reduktion über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in 80%igem (V/V) wäbrigem Dimethylformamid während 6 st bei Raumtemperatur in Gegenwart von 2 Äquivalenten Chlorwasserstoff.

Stufe 27)

2,83 ml (29,5 mMol) Äthylchloroformiat wurden zu einer Lösung von 8,24 g (31 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucin und 4,55 ml (32,5 mMol) Triäthylamin in 100 ml Tetrahydrofuran bei -10 bis -15°C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 min bei dieser Temperatur gerührt und wurde dann in eine heftig gerührte Lösung von 5,79 g (31 mMol) N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginin in 15,5 ml (31 mMol) 2n Natriumhydroxyd und 50 ml Dimethylformamid bei -10°C eingeschüttet. Das Rühren wurde 30 min bei -10°C und dann 1 st bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde zwischen 50 ml Äthylacetat und 50 ml Wasser verteilt. Die wäßrige Phase wurde abgetrennt und mit zwei weiteren Portionen Äthylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 25 ml Wasser gewaschen und verworfen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit gesättigter Zitronensäurelösung angesäuert und mit dreimal 100 ml Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt, mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockene eingedampft. Umkristallisation des Rückstands aus Äthylacetat/Petroläther (Kp 60-80°C) ergab das Dipeptid, Ausbeute 8,98 g, (62%), Fp 150-165°C (Zersetzung).

Stufe 28

Eine Lösung von 9,2 g (20 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-(N<sup>ω</sup>-nitro)-L-arginin, 4,2 g (20 mMol) L-Prolylazaglycinamidhydrochlorid, 5,4 g (40 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 3 ml

709847/0899

(20 mMol) Triäthylamin in 200 ml Dimethylformamid wurde auf 0°C abgekühlt und 8,2 g (40 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dicyclohexylharnstoff wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat wurde zur Trockene eingedampft. Umkristallisation des Rückstands aus Methanol/Äther ergab das Tetrapeptidderivat, Ausbeute 12,2 g (98,3%), Fp 88 bis 90°C,  $[\alpha]_D^{24}$  -30,2° (c, 1,6 in Dimethylformamid),  $R_f^D$  0,57,  $R_f^F$  0,40,  $R_f^H$  0,26,  $R_f^K$  0,63.

#### Stufe (29)

Hydrierung über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in wäbrigem Äthanol während 16 st in Gegenwart von 2 Äquivalenten Chlorwasserstoff.

#### Stufe (30)

6,484 g (11,0 mMol) N-Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin-2,4,5-trichlorophenylester und 1,396 g (10 mMol) D-Alanin-methylesterhydrochlorid wurden in 50 ml Dimethylformamid aufgelöst und 1,4 ml (10,0 mMol) Triäthylamin wurden zur Lösung zugegeben, die über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet und der Rückstand wurde aus heißem Äthylacetat kristallisiert, Ausbeute 3,782 g (77,2%), des geschützten Dipeptidmethylesters, Fp 163°C,  $[\alpha]_D^{24,8}$  -12,84° (c, 1,1 in Dimethylformamid).

#### Stufe (31)

3,435 g (7,0 mMol) N-Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-D-alanin-methylester wurden in 400 ml warmem Methanol aufgelöst und die Lösung wurde mit 10 ml (120 mMol) 62%igem (G/V) Hydrazinhydrat behandelt und das Gemisch wurde über Nacht bei 25°C

stehen gelassen. Das Hydrazid wurde abfiltriert, mit Methanol und Äther gewaschen und zweimal aus siedendem Methanol kristallisiert, Ausbeute 3,068 g (89,2%), Fp 217°C,  $[\alpha]_D^{24} -20,44^\circ$  (c, 1,1 in Dimethylformamid)  $R_fA$  0,73,  $R_fB$  0,75,  $R_fC$  0,67,  $R_fD$  0,70,  $R_fE$  0,50,  $R_fF$  0,54,  $R_fH$  0,67,  $R_fK$  0,85,  $R_fQ$  0,25.

#### Stufen 32 und 33

Zu einer auf -20°C abgekühlten und gerührten Lösung von 1,18 g (2,4 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-D-alaninhydrazid wurden 1,6 ml (9,6 mMol) einer 6,02m Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan zugegeben, worauf sich der Zusatz von 0,29 ml (2,52 mMol) t-Butylnitrit anschloß. Nach 15 min wurde eine auf -20°C vorgekühlte Lösung von 1,03 g (2,0 mMol) L-Leucyl-L-arginyl-L-prolylazaglycinamid-dihydrochlorid und 1,62 ml (11,6 mMol) Triäthylamin in 15 ml Dimethylformamid zugegeben. Das Rühren wurde 24 st bei 4°C fortgesetzt. Triäthylaminhydrochlorid wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde auf eine Silicagelkolonne aufgegeben und die Kolonne wurde mit 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform, 10%igem (V/V) Methanol in Chloroform und einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (11:8:2 V/V) eluiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und eingedampft und das Peptid wurde nochmal auf einer Silicagelkolonne unter Verwendung von Acetonitril/Wasser (3:1 V/V) als Eluiermittel chromatografiert. Ausbeute 890 mg (46,4%),  $[\alpha]_D^{25} -45,7^\circ$  (c, 1,1 in Methanol),  $R_fA$  0,54,  $R_fB$  0,69,  $R_fC$  0,41.

#### Stufe 34

Wie Stufe 11).

Stufe 35

Wie Stufe 15, Ausbeute 43%,  $[\alpha]_D^{25} -41,4^\circ$  (c, 1,3 in Methanol),  $R_fA$  0,80,  $R_fC$  0,47,  $R_fD$  0,65,  $R_fK$  0,95.

Stufe 38

Wie Stufe 31, Ausbeute 69%, Fp  $135^\circ C$ ,  $R_fA$  0,49,  $R_fB$  0,65,  $R_fC$  0,46,  $R_fD$  0,64,  $R_fF$  0,35,  $R_fH$  0,19,  $R_fK$  0,86.

Stufe 39

Wie Stufe 4

Stufe 40 (A=D-Phe)

Eine Lösung von 7,41 g (24,8 mmol) N-Benzoyloxycarbonyl-D-phenylalanin und 3,62 g (25 mmol) L-Leucinmethylester in 100 ml Äthylacetat wurde auf  $0^\circ C$  abgekühlt und 5,15 g (25 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei  $4^\circ C$  gerührt. Die übliche Aufarbeitung und anschließende Umkristallisation des Rückstands aus Äthylacetat/Petroläther (Kp  $60-80^\circ C$ ) ergab das Dipeptid, Ausbeute 9,1 g (86%), Fp 123 bis  $124^\circ C$ ,  $[\alpha]_D^{26} -18,7^\circ$  (c, 2,1 in Methanol),  $R_fD$  0,76,  $R_fE$  0,65,  $R_fF$  0,74,  $R_fH$  0,73.

Stufe 41 (A=D-Phe)

Katalytische Reduktion über einem 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in Äthanol mit einem Gehalt an 1 Äquivalent Chlorwasserstoff während 5 st.

Stufe 42) (A=D-Phe)

Zu einer gerührten Lösung von 4,89 g (8,36 mMol) N-Benzoyloxy-carbonyl-O-benzyl-L-tyrosin-2,4,5-trichlorphenylester und 2,5 g (7,6 mMol) D-Phenylalanyl-L-leucin-methylester-hydrochlorid in Dimethylformamid wurden 1,1 ml (7,6 mMol) Triäthylamin zugegeben und das Rühren wurde über Nacht bei Raumtemperatur fortgesetzt. Triäthylaminhydrochlorid wurde abfiltriert und das Filtrat wurde zur Trockene eingedampft. Umkristallisation des Rückstands aus wässrigem Methanol ergab das Tripeptidderivat, Ausbeute 3,6 g (69,7%), Fp 183-184°C,  $R_fD$  0,82,  $R_fE$  0,69,  $R_fH$  0,78,  $R_fP$  0,71,  $R_fQ$  0,82.

Stufe 43 (A=D-Phe)

Eine Lösung von 3,42 g (5,04 mMol) des vorstehenden Methylesters und 60 mMol Hydrazinhydrat in 30 ml Dimethylformamid wurde bei Raumtemperatur 4 st lang gerührt und auf ein kleines Volumen konzentriert, worauf das Hydrazid durch Zusatz von 500 ml Wasser ausgefällt wurde. Es wurde gesammelt, mit Wasser, Methanol/Äther (1:4 V/V) und Äther gewaschen und getrocknet, Ausbeute 2,94 g, (85,9%), Fp 179-180°C,  $R_fA$  0,81,  $R_fB$  0,79,  $R_fC$  0,88,  $R_fD$  0,69,  $R_fE$  0,49,  $R_fF$  0,65,  $R_fH$  0,67,  $R_fP$  0,25,  $R_fQ$  0,57.

Stufen 44 und 45 (A=D-Phe)

1,83 ml (11 mMol) einer 6,02m Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan wurden zu einer Lösung von 1,85 g (2,75 mMol) N-Benzoyloxy-carbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucin-hydrazid in 5 ml Dimethylformamid bei -20°C zugegeben, worauf sich der Zusatz von 0,33 ml (2,89 mMol) t-Butylnitrit anschloß. Nach 2 min wurde eine auf -20°C vorgekühlte Lösung von 1,89 ml (13,5 mMol) Triäthylamin und 1,02 g (2,5 mMol) N-Nitro-L-arginyl-L-prolylazaglycinamid-hydrochlorid in 10 ml Dimethylform-

amid zugegeben, worauf das Reaktionsgemisch über Nacht bei 4°C gerührt wurde. Die übliche Aufarbeitung ergab das Hexapeptidderivat, das weiter durch Silicagelkolonnenchromatografie (120 g Silicagel) unter Verwendung von 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform, 10%igem (V/V) Methanol in Chloroform und einem Gemisch von Chloroform/Methanol/Wasser (11:8:2 V/V) als Eluierlösungsmittel gereinigt wurde, Ausbeute 0,74 g, (29,3%), Fp 137-139°C,  $R_fA$  0,68,  $R_fB$  0,72,  $R_fC$  0,58,  $R_fD$  0,62,  $R_fH$  0,39,  $R_fK$  0,95.

#### Stufen 46), 47 und 48

10 mMol L-Pyroglutamyl-L-histidin-hydrazid wurden in das Azid überführt, wie es beim Verfahren (a) beschrieben ist und dann mit 11 mMol L-Tryptophyl-L-serin-methylester (hergestellt durch Hydrierung des N-Benzoyloxycarbonylderivats über einem 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in Dimethylformamid) während 30 min bei -10°C und 24 st bei 4°C gekuppelt. Triäthylaminhydrochlorid wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat wurde zur Trockene eingedampft. Das rohe Peptid wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von 10%igem (V/V) Methanol in Chloroform, 20%igem (V/V) Methanol in Chloroform und einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (11:8:2 V/V) als Eluiermittel gereinigt, Ausbeute 70%, Fp 142-145°C, (Zersetzung),  $R_fA$  0,39,  $R_fB$  0,72,  $R_fC$  0,45,  $R_fD$  0,48,  $R_fK$  0,61.

#### Stufe 49

5,4 mMol L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-serin-methylester wurden in 70 ml Dimethylformamid aufgelöst und mit 100 mMol Hydrazinhydrat 4 st behandelt. Dimethylformamid wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit Äthanol trituriert, gesammelt, mit Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet (88,2%), Fp 184 bis 189°C,  $R_fA$  0,18,  $R_fB$  0,55,  $R_fC$  0,39,  $R_fD$  0,27,  $R_fK$  0,58.

709847/0899

Stufe 50 (A=D-Trp)

4,87 g (23,6 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid wurden zu einer Lösung von 7,27 g (21,5 mMol) N-Benzyloxycarbonyl-D-tryptophan, 3,12 g (21,5 mMol) Leucinmethylester und 5,8 g (43 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol in 50 ml Dimethylformamid bei 0°C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und in der üblichen Weise aufgearbeitet. Umkristallisation aus Äthylacetat/Petroläther (Kp 60-80°C) ergab 9,55 g des Dipeptidderivats, welches bei Dünnschichtchromatografie Spuren von Verunreinigungen zeigte. Es wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie (300 g Silicagel) unter Verwendung von Chloroform und 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Eluierlösungsmittel gereinigt. Ausbeute 9,18 g, (91,7%), Fp 151-153°C,  $R_fA$  0,84,  $R_fB$  0,80,  $R_fC$  0,86,  $R_fD$  0,78,  $R_fE$  0,61,  $R_fF$  0,68,  $R_fH$  0,73,  $R_fP$  0,55,  $R_fQ$  0,73.

Stufe 51 (A=D-Trp)

Katalytische Reduktion in 80%igem (V/V) wäbrigem Dimethylformamid über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator während 5 st.

Stufe 52 (A=D-Trp)

Eine Lösung von 11,69 g (20 mMol) N-Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin-2,4,5-trichlorophenylester und 6,26 g (19 mMol) D-Tryptophyl-L-leucin-methylester in 100 ml Dimethylformamid wurde 60 st bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet und der Rückstand wurde aus Äthylacetat/Petroläther (Kp 60-80°C) kristallisiert. Dabei wurde das Tripeptidderivat erhalten, Ausbeute 8,52 g, (62,5%), Fp 165-166°C,  $R_fA$  0,78,  $R_fB$  0,73,  $R_fC$  0,84,  $R_fD$  0,80,  $R_fE$  0,62,  $R_fF$  0,70,  $R_fH$  0,76,  $R_fP$  0,58,  $R_fQ$  0,68.

709847/0899

Stufe 53 (A=D-Trp)

Eine Lösung von 7,26 g (10,1 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucin-methylester in einem Gemisch aus 200 ml Methanol und 50 ml Dimethylformamid wurde mit 100 mMol Hydrazinhydrat bei Raumtemperatur behandelt.

Nach 24 st wurde die Lösung auf ungefähr 30 ml konzentriert, worauf 500 ml Wasser zugegeben wurden. Das Tripeptidhydrazid wurde gesammelt, mit Wasser, Methanol/Äther (1:4 V/V) und Äther gewaschen und getrocknet, Ausbeute 6,86 g, (94,6%), Fp 200-202°C, R<sub>f</sub>A 0,90, R<sub>f</sub>B 0,95, R<sub>f</sub>C 0,90, R<sub>f</sub>D 0,74, R<sub>f</sub>Q 0,59.

Stufen 54 und 55 (A=D-Trp)

Eine gerührte und auf -20°C abgekühlte Lösung von 1,97 g (2,75 mMol) N-Benzylloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucin-hydrazid in 10 ml Dimethylformamid wurde mit 1,83 ml (11 mMol) einer 6,02m Lösung von Chlorwasserstoff in Dioxan und dann mit 0,33 ml (2,89 mMol) t-Butylnitrit behandelt. Nach 2 min wurde eine auf -20°C vorgekühlte Lösung von 1,02 g (2,5 mMol) N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginyl-L-prolyl-azaglycin-amid-hydrochlorid und 1,89 ml (13,5 mMol) Triäthylamin in 10 ml Dimethylformamid zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 4°C gerührt. Es wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet, und der Rückstand (1,27 g) wurde auf eine Silicagelkolonne (230 g Silicagel) aufgegeben. Die Kolonne wurde mit Chloroform und 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform eluiert. Ausbeute 0,91 g (34,4%), Fp 139-140°C (Zersetzung), R<sub>f</sub>A 0,67, R<sub>f</sub>B 0,72, R<sub>f</sub>C 0,58, R<sub>f</sub>D 0,62, R<sub>f</sub>H 0,34, R<sub>f</sub>K 0,95.

709847/0899



Stufe 56 (A=D-Tyr(Me))

Eine Lösung von 3,17 g (9,64 mMol) Z-D-Tyr(Me)-OH, 1,92 g (10,6 mMol) Leu-OMe.HCl, 2,6 g (19,2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 1,6 ml (11 mMol) Triäthylamin in 30 ml Dimethylformamid wurde auf 0°C abgekühlt und 2,29 g (11,1 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 4°C gerührt und in der üblichen Weise aufgearbeitet. Umkristallisation aus heißem Cyclohexan ergab das geschützte Dipeptidderivat. Ausbeute 1,41 g (95,2%),  $R_fD$  0,83,  $R_fE$  0,69,  $R_fP$  0,72,  $R_fQ$  0,76.

Stufe 57 (A=D-Tyr(Me))

Katalytische Reduktion über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in Methanol/Dimethylformamid/Wasser (8:1:1) mit einem Gehalt an 1,2 Äquivalenten Chlorwasserstoff während 3 st.

Stufe 58 (A=D-Tyr(Me))

Eine Lösung von 8,2 mMol Z-Tyr(Bzl)-OCp, 8,2 mMol D-Tyr(Me)-Leu-OMe.HCl und 8,2 mMol Triäthylamin in 60 ml Dimethylformamid wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Gemisch wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet. Das Produkt wurde mit Äther filtriert, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 81,2%,  $F_p$  191-192°C,  $R_fD$  0,85,  $R_fE$  0,73,  $R_fF$  0,72,  $R_fQ$  0,78.

Stufe 59 (A=D-Tyr(Me))

12,9 mMol Hydrazinhydrat wurden zu einer Lösung von 4,59 g (6,4 mMol) Z-Tyr(Bzl)-D-Tyr(Me)-Leu-OMe in 25 ml Dimethylformamid und 50 ml Methanol zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Methanol

wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde mit Wasser ausgefällt, gesammelt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Fp 212-213°C,  $R_fE$  0,49,  $R_fF$  0,66,  $R_fH$  0,69,  $R_fQ$  0,70.

Stufen (60) und (61) (A=D-Tyr(Me))

3,54 g (5,0 mMol) des Hydrazids aus Stufe (59) wurden in 10 ml DMF aufgelöst und die gerührte Lösung wurde auf -20°C abgekühlt. 3,38 ml (20 mMol) 5,92m HCl in Dioxan wurden zugegeben, worauf sich der Zusatz von 0,6 ml (5,25 mMol) t-Butylnitrit anschloß. Nach 2 min wurde eine vorgekühlte Lösung von 2,04 g (5 mMol) H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Azgly-NH<sub>2</sub>·HCl und 3,55 ml (25 mMol) Triäthylamin in 10 ml DMF zugegeben und das Rühren wurde über Nacht bei 4°C fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet und das rohe Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform, 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform und 10%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Eluierlösungsmittel gereinigt. Ausbeute 3,72 g (70,9%),  $R_fA$  0,64,  $R_fB$  0,72,  $R_fC$  0,55,  $R_fD$  0,66,  $R_fF$  0,40,  $R_fH$  0,52.

Stufe 62 (A=D-Ser(Bu<sup>t</sup>))

Wie Stufe 56. Das Produkt wurde aus wäbrigem Methanol kristallisiert. Ausbeute 90,4%, Fp 107-108°C,  $R_fD$  0,80,  $R_fE$  0,68,  $R_fF$  0,73,  $R_fH$  0,72,  $R_fP$  0,72,  $R_fQ$  0,74.

Stufe 63 (A=D-Ser(Bu<sup>t</sup>))

Katalytische Reduktion über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holz-kohle-Katalysator in DMF/Wasser (8:2) während 5 min.

Stufe 64 (A=D-Ser(Bu<sup>t</sup>))

Eine Lösung von 19,17 g (32,7 mMol) Z-Tyr(Bzl)-OCp und 32,7 mMol H-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Leu-OMe in 100 ml Dimethylformamid wurde 72 st bei Raumtemperatur stehen gelassen. Übliche Aufarbeitung ergab einen Feststoff, der gesammelt, mit Äther gewaschen und getrocknet wurde. Ausbeute 17,6 g (79,4%), Fp 135-137°C, R<sub>f</sub>D 0,80, R<sub>f</sub>H 0,77, R<sub>f</sub>Q 0,81.

Stufe 65 (A=D-Ser(Bu<sup>t</sup>))

Wie Stufe 59. Umkristallisation aus wäbrigem Methanol. Ausbeute 56,2%, Fp 134-136°C, R<sub>f</sub>D 0,66, R<sub>f</sub>H 0,64, R<sub>f</sub>Q 0,64.

Stufen 66 und 67 (A=D-Ser(Bu<sup>t</sup>))

Wie Stufen 60 und 61. Das Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform und 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Eluierlösungsmittel gereinigt. Ausbeute 38,5%, Fp 142-145°C, R<sub>f</sub>A 0,64, R<sub>f</sub>B 0,71, R<sub>f</sub>C 0,55, R<sub>f</sub>D 0,65, R<sub>f</sub>F 0,46, R<sub>f</sub>H 0,43, R<sub>f</sub>Q 0,16.

Stufe 68 (A=D-Tyr(Me))

5,13 g (24,9 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid wurden zu einer auf 0°C abgekühlten und gerührten Lösung von 22,6 mMol Z-D-Tyr(Me)-OH, 5,98 g (24,9 mMol) H-MeLeu-OMe.HBr, 3,5 ml (24,9 mMol) Triäthylamin und 6,12 g (45,2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol in 50 ml DMF zugegeben und das Rühren wurde über Nacht bei 4°C fortgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet und das Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform als Lösungsmittel gereinigt. Ausbeute 55,2%, Öl, R<sub>f</sub>D 0,83, R<sub>f</sub>E 0,78, R<sub>f</sub>H 0,79, R<sub>f</sub>P 0,80, R<sub>f</sub>Q 0,79.

Stufe 69 (A=D-Tyr(Me))

Katalytische Reduktion über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holzkohle-Katalysator in Methanol/Wasser (8:2 V/V) mit einem Gehalt an 1 Äquivalent Chlorwasserstoff während 6 st.

Stufe 70 (A=D-Tyr(Me))

Wie Stufe 58. Das Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Äther als Lösungsmittel gereinigt.

Stufe 71 (A=D-Tyr(Me))

Eine Lösung von 4,85 g (6,69 mMol) Z-Tyr(Bzl)-D-Tyr(Me)-MeLeu-OMe und 120,7 mMol Hydrazinhydrat in 150 ml Methanol wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Hydrazid wurde durch Zusatz von Wasser ausgefällt, gesammelt und aus Methanol/Wasser kristallisiert. Ausbeute 91,1%, Fp 129-131°C,  $R_fD$  0,79,  $R_fE$  0,60,  $R_fF$  0,68,  $R_fH$  0,73,  $R_fQ$  0,77.

Stufen 72 und 73 (A=D-Tyr(Me))

Umkristallisiert aus Methanol/Äther, Ausbeute 23,8%, Fp 152 bis 154°C,  $R_fA$  0,67,  $R_fB$  0,68,  $R_fC$  0,58,  $R_fD$  0,59,  $R_fH$  0,50,  $R_fK$  0,94,  $R_fQ$  0,35.

Stufe 74

1,8 ml (18 mMol) Äthylchloroformiat wurden zu einer auf -15°C abgekühlten und gerührten Lösung von 5,99 g (20 mMol) Z-Phe-OH und 2,2 ml (20 mMol) N-Methylmorpholin in 60 ml DMF zugegeben. Nach 2 min wurde eine auf -15°C vorgekühlte Lösung von 4,8 g (20 mMol) H-MeLeu-OMe.HBr und 2,8 ml (20 mMol) Triäthylamin in 20 ml DMF zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei

709847/0899

0°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde in der üblichen Weise aufgearbeitet. Ausbeute 7,54 (90%), Öl.

Stufe 75

Katalytische Reduktion über 5%igem (G/G) Palladium-auf-Holz-kohle-Katalysator in Methanol mit einem Gehalt an 1 Äquivalent Chlorwasserstoff während 3 st.

Stufe 76

Hergestellt durch Kuppeln von 16,02 g (43,2 mMol) Z-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-OH und 13,15 g (40,0 mMol) H-D-Phe-MeLeu-OMe.HCl wie in Stufe 74. Das Produkt wurde durch Silicagelkolonnenchromatografie unter Verwendung von Chloroform und 5%igem (V/V) Methanol in Chloroform als Lösungsmittel gereinigt. Ausbeute 60%, Öl, R<sub>f</sub>G 0,48, R<sub>f</sub>P 0,71, R<sub>f</sub>Q 0,73.

Stufe 77

Eine Lösung von 6,52 g (9,76 mMol) Z-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-D-Phe-MeLeu-OMe und 97,6 mMol Hydrazinhydrat in 50 ml Methanol wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Methanol wurde im Vakuum entfernt und das Hydrazid wurde aus Methanol/Äther kristallisiert mit Methanol/Wasser (1:1 V/V) und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 5,2 g (80%), Fp 135°C, R<sub>f</sub>D 0,75, R<sub>f</sub>E 0,69, R<sub>f</sub>F 0,66, R<sub>f</sub>H 0,79, R<sub>f</sub>Q 0,73.

Stufen 78 und 79.

Wie Stufen 60 und 61. Während des Aufarbeitungsverfahrens fiel das Produkt aus Äthylacetat aus. Es wurde abfiltriert, mit Äthylacetat und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 58,5%, Fp 145-148°C, R<sub>f</sub>D 0,72, R<sub>f</sub>F 0,40, R<sub>f</sub>H 0,53, R<sub>f</sub>Q 0,18.